

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Select d.
To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/>	Format <input type="text" value="Free"/>
--	---	--	---	---	---

1. ☐ 2/5/1

007911307

WPI Acc No: 1989-176419/198924

XRAM Acc No: C89-078242

Highly unsatd. fatty acid-contg. diacyl glycerol prepn. -
starting from glycerophospho-choline and satd. or mono-ethylenically
unsatd. fatty acid

Patent Assignee: NIPPON OILS & FATS CO LTD (NIOF)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 64002589	A	19890106	JP 87158726	A	19870625	198924 B

Priority Applications (No Type Date): JP 87158726 A 19870625

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 64002589 A 8

Abstract (Basic): JP 64002589 A

1,2-Diacyl-Sn-3- glycerophosphocholine is obtd. by reacting
glycerophosphocholine satd. fatty acid or monoethylenically unsatd.
fatty acid. 1-Acyl-Sn-3-glycerophosphocholine is obtd. by treating
1,2-diacyl-Sn-3-glycerophosphocholine with phospholipase A.
1-acyl-2-highly unsatd. fatty acid-Sn-3-glycerophosphocholine is obtd.,
by reacting 1-acyl-Sn-3-glycerophosphocholine with highly unsatd. fatty
acid. 1-acyl-2-highly unsatd. fatty acid diacyl glycerol is obtd. by
treating 1-acyl-2-highly unsatd. fatty acid -Sn-3-glycerophosphocholine
with phospholipase C.

USE/ADVANTAGE - Diacylglycerol contg. highly unsatd. fatty acid at
Sn-2 posn., is provided in high yield by as simple a process as
possible.

0/0

Title Terms: HIGH; UNSATURATED; FATTY; ACID; CONTAIN; DI; ACYL; GLYCEROL;
PREPARATION; START; GLYCERO; PHOSPHO; CHOLINE; SATURATE; MONO; ETHYLENIC;
UNSATURATED; FATTY; ACID

Derwent Class: D16; E17

International Patent Class (Additional): C07F-009/10; C12P-009/00

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="button" value="Print/Save Selected"/>	<input type="button" value="Send Results"/>	<input type="button" value="Display Selected"/>	Format <input type="text" value="Free"/>
--	---	--	---	---	---

© 2002 The Dialog Corporation plc

⑫ 公開特許公報(A) 昭64-2589

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月6日

C 12 P 9/00
C 07 F 9/107236-4B
6917-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 高度不飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロールの製造方法

⑯ 特 願 昭62-158726

⑰ 出 願 昭62(1987)6月25日

⑱ 発 明 者 日 比 野 英 彦 東京都練馬区旭丘2-22
 ⑱ 発 明 者 福 田 信 雄 茨城県新治郡桜村梅園2-24-5
 ⑲ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
 ⑳ 代 理 人 弁理士 柳 原 成

明 細 書

1. 発明の名称

高度不飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロールの
製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) (A) グリセロホスホコリンと飽和脂肪酸またはモノエン脂肪酸を反応させて 1,2-ジアシル-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程。
 (B) 1,2-ジアシル-Sn-3-グリセロホスホコリンをホスホリパーゼA₂により処理して1-アシル-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程。
 (C) 1-アシル-Sn-3-グリセロホスホコリンと高度不飽和脂肪酸を反応させて 1-アシル-2-高度不飽和脂肪酸-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程。
 および
 (D) 1-アシル-2-高度不飽和脂肪酸-Sn-3-グリセロホスホコリンをホスホリパーゼCにより処理して 1-アシル-2-高度不飽和脂肪酸ジアシルグリセロールを得る工程
 を含む高度不飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロー

ルの製造方法。

(2) 飽和脂肪酸およびモノエン脂肪酸は炭素数10以上のものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 高度不飽和脂肪酸は炭素数18以上、不飽和結合が3個以上のものである特許請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は高度不飽和脂肪酸（以下、PUFAという）をSn-2位に含有するジアシルグリセロール（以下、DGという）の製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

天然DGは脂質の代謝過程で生成され、生体脂質から必ず見られる微量成分である。UGは立体特異性からSn-1,2型、2,3型、1,3型が存在することが知られている。これらの個々の立体特異的異性体の合成や分離が従来から検討されてきた。Sn-1,2型と2,3型はβ-DGと一般に呼ばれ、この両者は旋光度でも識別することは困難とされている。

しかもこの両者は分析的にも分離できない。Sn-1,3型は α -DGと一般に呼ばれ、 β -DGとの分離は容易であり、 β -DGのSn-2位の脂肪酸のアシル転移により生成する。

天然に存在するDGはSn-1,2型であり、構成する脂肪酸は多成分であるため、DGの分子種は複雑であり、特定の分子種のみを単離することは難しい。このDGは総脂質中でトリアシルグリセロール（以下、TGという）、モノアシルグリセロール（以下、AGという）、コレステロールエステルおよび遊離コレステロール等とともに単純脂質中に見出される。特に最近の生化学の進歩により、これらの単純脂質もリン脂質や糖脂質等の極性脂質とともに細胞膜を形成していることが知られ、DGも細胞表面で刺激に対応して細胞の活性化因子として働くことも明らかになっている。そのため従来の蓄積脂肪であるTGの前駆体としてのDGの役割の他に、新しい生理活性の検討が行われている。現在までに発見されている生理活性には神経細胞のリン脂質合成能の回復、ガン細胞の正常誘導などが認め

られている。

生理活性を有するDGは、細胞膜に共存して複雑な生理機能を支配しているリン脂質とグリセロール骨格の立体特異性が共通である。すなわち生理活性を有するDGはSn-1,2型であり、Sn-1位はパルミチン酸やオレイン酸のような飽和またはモノエン酸が主体で、Sn-2位はアラキドン酸、EPA（エイコサペンタエン酸）、DHA（ドコサヘキサエン酸）のようなPUFAが主体となる分子種である。

PUFAは水産動物の脂肪組織、哺乳動物の臓器や血球に見出されるが、主にTGやリン脂質として存在し、DGとしての存在量は非常に少ないので、PUFAを含有するDGを分離する原料には不適である。

一方、Sn-1位とSn-2位にそれぞれ別の脂肪酸が組み込まれたSn-1,2DGを合成する方法がすでに知られている（桑田勉、改稿油脂化学、岩波文庫、P.111~117、1963、岩波書店）。この方法によりグリセロールのSn-2位にPUFAを結合した遊離基DG（以下、2P-DGという）の合成を行うとすれば、次のような方法となる。まず α -モノクロロヒドリ

ンの一級水酸基をPUFA以外の脂肪酸のクロライドでアシル化し、次いでPUFAクロライドでSn-2位をアシル化する。さらにこのアシル化物を硫酸銀処理、希酸処理を経由して目的物を合成する。

【発明が解決しようとする問題点】

しかし、このような従来法では次の問題点がある。

① 銀クロライドで生成する水酸基がSn-2位に転位し、多量のSn-1,3DGを生成する。

② 目的物中にSn-1,2DGとSn-2,3DGが混在し、両者を識別できない。

③ 脂肪酸のクロライド化に關し、化学変化に弱いPUFAのクロライド化に対する配慮がなされていないので、日時中のPUFAの二重結合に異性化が生じ易い。

そのため得られるDGは細胞レベルの実験で、正しい立体構造の識別を行う酵素やレセプターに対して正確に認識されない。

現在、脂質の生合成過程でSn-2位にPUFAを含有するDGが絶えず産生されていることは証明されて

いるが、この立体特異性を保持して生理作用を発揮できるDGの効率良い合成法や単離法は見当たらない。

本発明の目的は、高効率で、できるだけ簡単な工程によりPUFAをSn-2位に含むDGを製造する方法を提案することにある。

【問題点を解決するための手段】

本発明は、

(A) グリセロホスホコリンと飽和脂肪酸またはモノエン脂肪酸を反応させて1,2-ジアシル-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程、

(B) 1,2-ジアシル-Sn-3-グリセロホスホコリンをホスホリパーゼ A_2 により処理して1-アシル-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程、

(C) 1-アシル-Sn-3-グリセロホスホコリンと高価不飽和脂肪酸を反応させて1-アシル-2-高価不飽和脂肪酸-Sn-3-グリセロホスホコリンを得る工程、および

(D) 1-アシル-2-高価不飽和脂肪酸-Sn-3-グリセロホスホコリンをホスホリパーゼCにより処理

して1-アシル-2-高度不飽和脂肪酸ジアシルグリセロールを得る工程
を含む高度不飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロールの製造方法である。

本発明で用いるグリセロホスホコリン(以下、GPCという)は一般にL- α -GPCと呼ばれるもので、系名はSn-グリセロール-3-ホスホリルコリンであり、立体特異的(Sn番号)にグリセロールの3位がホスホリルコリンによって覆われており、1位、2位は遊離脂肪酸となっている。このようなGPCは天然PCをテトラブチルアンモニウムヒドロキシドで脱アシル化し、遊離状態ではメタノール溶液として、また結晶状態では塩化カドミウム複合体として回収することができる。このGPCのアシル化は遊離状態でも結晶状態でも反応は進行するので、化学精造や原料としての入手からも好ましい原料である。

また飽和脂肪酸またはモノエン脂肪酸は炭素数10以上のものが好ましく、例えばカプリン酸からメリシン酸までの飽和脂肪酸やミリストレイン

酸からネルボン酸までのモノエン脂肪酸などがあげられるが、生体組織に見出されるミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などが特に好ましい。このような飽和脂肪酸やモノエン脂肪酸は純度90%以上の工業製品が市販されており、特に生理活性を有するDGのSn-1位から見出されるパルミチン酸やオレイン酸は純度90%以上の市販品が市販されている。

本発明で使用するPUFAは炭素数18以上、不飽和結合が3個以上のものが好ましく、例えば γ -リノレン酸、ジホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、EPA、ドコサヘンタエン酸、DHA等があげられる。これらのPUFAの内、ジホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸等も高純度品が市販され、また豚、肝臓、血球等にも存在し、その分離法も数多く提案されている。EPA、ドコサヘンタエン酸、DHA等は魚油、卵黄リン脂質、脳等に存在し、加水分解、尿素付加、分子置留、カラムクロマトグラフィー等を組合せることにより、高純度品が単離できる。

上記の各脂肪酸は酸無水物、酸塩化物、酸イミ

ダゾール塩等に変換して用いられる。また上記の各脂肪酸を用いて、後述の製造工程を経ても、不飽和脂肪酸は二重結合の位置異性化や幾何異性化を生ぜず、1-飽和脂肪酸またはモノエン脂肪酸-2-PUFA-DGが得られる。特にPUFAは誘導化に際して二重結合のマイグレーションが生じ易いため、反応生成物のチェックを行ったところ、マイグレーションは認められなかった。出発原料から目的物までの二重結合のマイグレーションのチェックは、IR(1056~940 cm^{-1} :直立トランス異性体)、UV(233 μm :共役ジエン酸、268 μm :共役トリエン酸)で行い、目的物はFAB-MS($\text{H}+\text{H}^+$)で分子量を確認後、加水分解して得たPUFAは、ジオメタンでエステル化し、キャピラリーカラムGCで二重結合のマイグレーションに基因するアピーファクト(人工的生成物)のないことを確認した。

PUFA含有DGは次の製造工程で製造される。まず(A)工程において、GPC単体またはGPC-塩化カドミウム複合体と、Sn-1位に組み込みたい飽和脂肪酸またはモノエン脂肪酸の酸無水物、酸塩化物、酸イミ

ミダゾール塩等とを、例えばジメチルアミノピリジン等の塩基性アミン触媒下で反応させ、精製して1,2-ジアシル-Sn-3-GPC(以下、DAPCという)を得る。次に(B)工程において、上記のDAPCをヘビホスホリルパーゼAにより処理して、Sn-2位を特異的に加水分解し、精製後1-アシル-Sn-3-GPC(リゾPC)を得る。次に(C)工程において、上記のリゾPCと、Sn-2位に組み込みたいPUFAとを、(A)工程と同様に反応させ、精製して1-アシル-2-PUFA-Sn-3-GPC(以下、PUFA-PCという)を得る。さらに(D)工程として、上記のPUFA-PCをPC分解型のホスホリルパーゼCにより処理して、Sn-3位のグリセロールの水酸基とホスホコリン基を結ぶリン酸ジエステル結合を加水分解し、これを精製してSn-1-アシル-2-PUFA-DGを得る。

本発明において用いるホスホリルパーゼCは一種のホスホジエステラーゼで、グリセロリン脂質やスフィンゴミエリンのリン酸ジエステル結合を加水分解し、DGやセラミドとリン酸モノエステルを生成する一群の酵素の総称である。この酵素は基

質特性からPC分解型、スフィンゴミエリン分解型およびホスファチジルイノシトール分解型の3種が存在するが、細菌が菌体外酵素として分泌するPC分解型を使用するのが好ましい。PC分解型のホスホリパーゼCの起滅としては、*Clostridium perfringens* や *Bacillus cereus* 等が知られ、市販品もある。

本発明において製造する 2P-DGはSn-1位およびSn-2位の組合せにより種々の化合物があり、代表的な化合物として、Sn-1-オレイル-2-ドコサヘキサエン、Sn-1-パルミトイル-2-ドコサヘキサエン、Sn-1-ステアロイル-2-アラキドン、Sn-1-ミリスチル-2-エイコサペンタエン、Sn-1-パルミトイル-2-アラキドンなどがあげられる。

本発明によって製造される 2P-DGは、細胞膜脂効果の他に未分化細胞（例えば癌細胞等）の正常細胞への分化誘導作用や神経細胞のリン脂質合成の加齢低下に対する合成能回復作用等を有しており、いずれも細胞膜流動性を変化させる薬剤として利用できる。

した。反応後沈澱物を濾別し、四塩化炭素を留去して得られた粗PCをメタノール/クロロホルム混合溶媒に溶解し、イオン交換樹脂アンバーライトIRC-50、IRA-45（ローム・アンド・ハース社製、商品名）を各5g加えて触媒を除去した。この粗PCをシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水（65/25/4、V/V/V）溶媒にて溶出し、ジオレイルPC 3.0gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(M+H)^+$ 785

TLC: クロロホルム/メタノール/水（65/25/4、V/V/V）R_F値=0.30

上記のジオレイルPC 3gを脱水ジクロロメタン 15mlに溶解し、この溶液にヘブホスホリパーゼA₂ (*Trimeresurus flavoviridis*、和光純薬工業(株)製) 6mg、0.1M塩化カルシウム溶液 2ml、0.2Mトリス-塩酸緩衝液 3mlを加えて、37℃で振盪しながら一昼夜反応させた。エタノールで反応を止め、Bligh-Dyer法により抽出した。抽出液を留去した後、アセトンで洗って遊離脂肪酸を除き粗

（発明の効果）

本発明の方法によれば、細胞内でホルモン刺激に応じて産生され、カルシウムイオン存在下に蛋白質酪化酵素を活性化させホルモン作用を発現するSn-2位にPUFAを有するSn-1,2-DGを天然の立体特性性を維持したまま、高収率で製造することができる。

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

オレイン酸 5.0g (17.7mM) を無水四塩化炭素 30mlに溶解後、ジシクロヘキシルカルボジイミド 1.6g (7.8mM) を添加し、40℃で4時間攪拌した。析出したジシクロヘキシルウレアを濾過して除き、濾液を減圧下、空室にて除去し、油状の無水オレイン酸 4.1gを得た。得られた無水オレイン酸を少量にジメチルスルホキシド 50mlを添加した瓶に、GPC 1g (3.9mM) およびジメチルアミノピリジン 1.05g (8.6mM) を加え、50℃で4時間激しく攪拌

し、リゾPC 2.8gを得た。粗リゾPCをシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水（65/25/4）溶媒にて溶出し、Sn-1-オレイル-GPC 2.5gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(M+H)^+$ 519

TLC: クロロホルム/メタノール/水（65/25/4、V/V/V）R_F値=0.12

DHA 10g (30.5mM) にジメチルホルムアミド 1.1g (15.3mM) とオキシ塩化リン 3.3g (21.3mM) の混液を38℃に保持しながら1時間かけて溶出した。さらに窒素気流下で30分間反応させた。窒素気流下、80~100℃で減圧蒸留してDHAクロライド 8gを得た。このものの分析値は次の通りである。

IR: 1050~940 cm⁻¹ トランス酸塩基

UV: 233nm 共役ジエン酸 4%

268nm 共役トリエン酸 5%

過酸化物量: 電位差測定法 22meq/kg

キャピラリーカラムGC: カーボワックス

20N液相、50m、200℃加水分解して得たDHAをジアゾメタンでメチル

化して測定した。二重結合のマイグレーションに基因するアーティファクトは認められなかった。

1-オレイル-GPC1 g (1.9mN) を、DHAクロライド 1.26 g (3.6mN) を消した脱水ジクロロメタン溶液 15ml 中に加え、さらにジメチルアミノピリジン 0.255 g (2.1mN) を加え、37℃で撹拌しながら一昼夜反応させた。室温放冷後、脱水アセトン 40ml を添加して撹拌混ぜると白色沈殿が生じた。得られた白色沈殿はクロロホルム/メタノール (2/1, V/V) 混液 50ml に溶解してシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, V/V/V) 混液にて溶出し、Sn-1-オレイル-2-DHA-GPC 1.5 g を得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: (H+N)*831

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, V/V/V) Rf値=0.32

得られたSn-1-オレイル-2-DHA-GPCの価700 mg を800 μlのメチルアルコールに溶解し、この溶液に細菌ホスホリパーゼC (*Clostridium perfringens* 産菌、生化学工業(株)製) を400 unit、

①、②の呈色反応はドラージェンドルフ試薬とデイトマー・レスター試薬に対し陰性で、ヨウ素、過マンガン酸カリ、硫酸に対し陰性であった。

FAB-MS: [(H+N)*: 689] 分子量 666
比旋光度: $[\alpha]_D^{20} = -4.8$ (C=0.22, CHCl₃)
HPLC: ODSカラム、メタノール 1 ml/min

単一ピーク

キャピラリーGC: カーボワックス 20H 検相、50 m、200℃

加水分解した得た脂肪酸をジアゾメタンでメチル化して測定した。オレイン酸とDHAが主成分であり、二重結合のマイグレーションに基因するアーティファクトは認められなかった。

高純化物質 + 単位重量当量 28 mg/g

実施例 2

パルミチン酸 5.0 g (23.6mN) を無水トリフルオロ酢酸 8.8 g (46.7mN) に添加し、38℃で1時間撹拌した。窒素気流下、撹拌しながら徐々に加熱し、温度が85℃に達してから5~50 ml 無水トリフルオロ酢酸を除去して白色粉末の無水パルミチン

0.2N トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を 6 ml、0.05N 塩化カルシウムを 3.5 ml、エチルエーテルを 4 ml 加えた。反応混合物をスクリーキャップ付 20 ml の試験管中にテフロンスターラーバーと共に加えて35℃で1時間攪拌しながらインキュベートした。反応混合物にエチルエーテルを12 ml 加えてから分液ロートに移し、抽出後、窒素気流下で濃縮した。この中にアセトン 1 ml 加えて沈殿除去し、炭酸ナトリウムで脱色し、窒素気流下で脱溶媒して、Sn-1-オレイル-2-DHA-DG 550 mg を得た。このものの分析値は次の通りである。

外観: 淡黄色透明の油状液体

溶解状態: ヘキサン、クロロホルムに可溶、水に不溶

TLC: ① クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, V/V/V) Rf値=0.8

② クロロホルム/アセトン/メタノール (80/9/1, V/V/V) Rf値=0.65

(Rf値0.65は標準体の未変態HG中のSn-1, 2DG; 一級名β-DGの位置に相当した。)

酸 5.6 g を得た。得られた無水パルミチン酸全量にジメチルスルホキシド 50 ml を添加した液に、GPC-塩化カドミウムコンプレックス 1.6 g とジメチルアミノピリジン 1.05 g (8.6mN) を加え、50℃で4時間攪拌して撹拌した。室温放冷後、脱水アセトン 80 ml を添加すると白色沈殿が生じた。得られた白色沈殿 5 g はクロロホルム/メタノール (2/1, V/V) 混液 100 ml に溶解し、これを分液ロートに移して、1N 塩酸 20 ml で3回洗浄を行い、中性になるまで水に洗浄した。クロロホルム層を回収して脱溶媒後、粗PC 4.6 g を回収してシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, V/V/V) 混液にて溶出し、ジバルミトイルPC 3 g を得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: (H+N)*733

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, V/V/V) Rf値=0.29

ジバルミトイルPC 3 g を脱水ジクロロエタン 15 ml に溶解し、この溶液にヘビ毒ホスホリパーゼA (*Crotalus adamanteus*, シグマ社製、) 7 mg、

0.1N塩化カルシウム溶液2ml、0.2Nトリス-塩酸緩衝液3mlを添加して37℃で攪拌しながら一昼夜反応させた。エタノールで反応を止め、Bligh-Dyer法により抽出した。抽出液を留去した後、アセトンで洗って遊離脂肪酸を除き粗リゾPC2.6gを得た。粗リゾPCをシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4、V/V/V)混液にて溶出し、Sn-1-パルミト-2-アラキドニル-GPC 1.4gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(M+H)^+496$

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4、V/V/V) Rf値=0.12

1-パルミト-2-アラキドニル-GPC 1 g (2.0mM) をアラキドン酸1.26 g (4.1mM) を溶かした脱色ジクロロメタン溶液15ml中に加え、さらにジメチルアミノピリジン0.256 g (2.1mM) とジシクロヘキシルカルボジイミド2.6 g (1.3mM) を加え、37℃で二昼夜反応させた。室温放冷後、沈殿物を濾過し、脱色アセトン40mlを添加して振って攪拌すると白色沈殿が生じた。得られた白色沈殿は クロロホルム/メタノール

(2/1、V/V) 混液50mlに溶解してシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4、V/V/V) 混液にて溶出し、Sn-1-パルミト-2-アラキドニル-GPC 1.4gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(M+H)^+781$

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4、V/V/V) Rf値=0.33

IR: 1050~940 cm^{-1} トランス二重結合

UV: 233 μ 共役ジエン酸 3%

258 μ 共役トリエン酸痕跡

過酸化物質: 電位差滴定法 33meq/kg

キャピラリーGC: カーボワックス 20% 凝相、50m、200℃

加水分解して得た脂肪酸をジアゾメタンでメチル化して測定した。二重結合のマイグレーションに基因するアーティファクトは認められなかった。得られたSn-1-パルミト-2-アラキドニル-GPCの一部700mgを800 μ lのメチルアルコールに溶解し、この溶液に細菌ホスホリパーゼC (Bacillus

corvus シグマ社製) を400unit、0.2Nトリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) を6ml、0.05N塩化カルシウムを3.5ml、エチルエーテルを4ml加えた。反応混合物をスクリーキャップ付20mlの試験管中にテフロンスターラーバーと共に加えて35℃で1時間攪拌し、反応混合物をインキュベーションした。反応混合物にエチルエーテルを12ml加えてから分液ロートに移し、抽出後、窒素気流下で濃縮した。この中にアセトン1ml加えて沈殿除去し、硫酸ナトリウムで脱水し、窒素気流下で脱溶媒して、Sn-1-パルミト-2-アラキドニルDG 510mgを得た。このものの分析値は次の通りである。

外観: 淡黄色の平円体

溶解性: ヘキサン、クロロホルムに可溶

水に不溶

TLC: ①クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4、V/V/V) Rf値=0.77

②クロロホルム/アセトン/メタノール (80/9/1、V/V/V) Rf値=0.65

[Rf値0.65は標準体の未蒸留DG中のSn-1,2DG; 一

般名 β -DGの位置に相当した。]

①、②の显色反応はドラーゲンドルフ試薬とデイトマー・レスター試薬に対し陰性で、ヨウ素、過マンガン酸カリ、硫酸に対し陽性であった。

FAB-MS: $((M+Na)^+ : 539)$ 分子量 616

比旋光度: $(\alpha)_D^{20} = -4.7$ (C=0.21 CHCl₃)

HPLC: ODSカラム、メタノール 1ml/min

単一ピーク

キャピラリーGC: カーボワックス 20% 凝相、50m、200℃

加水分解して得た脂肪酸をジアゾメタンでメチル化して測定した。パルミチン酸とアラキドン酸が主成分であり、二重結合のマイグレーションに基因するアーティファクトは認められなかった。

過酸化物質: 電位差滴定法 49meq/kg

実施例3

ミリスチン酸10.3g (45.2mM) を無水四塩化炭素40mlに溶解後、ジシクロヘキシルカルボジイミド3.7g (17.9mM) を添加し、40℃で4時間攪拌した。析出したジシクロヘキシルウレアを濾過して除き、

濾液を減圧下、室温にて除去し、白色結晶の無水ミリスチン酸8.2gを得た。得られた無水ミリスチン酸全量にジメチルスルホキシド60mlを添加した液に、GPC 2.0g (7.8mN)およびジメチルアミノピリジン1.6g (13.4mN)を加え、50℃で4時間激しく攪拌した。反応後沈殿物を濾別し、四塩化炭素を留去して得られた粗PCをメタノール/クロロホルム(1/2, v/v)に溶解し、イオン交換樹脂アンバーライトIRC-50, IRA-45を各8g加えて触媒を除去した。メタノール/クロロホルムを留去して再び粗PCを得、この粗PCをシリカゲルカラムに付してクロロホルム/メタノール/水(65/25/4, v/v/v)混液にて溶出し、ジミリスチルPC 5.1gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(N+H)^+$ 677

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, v/v/v) R_F値=0.28

ジミリスチルPC 5gを脱色ジクロルメタン15mlに溶解し、この溶液にハブ毒ホスホリパーゼA₂ (Tricresurus flavoviridis 和光純薬工業(株))

UV: 233nm 共役ジエン酸3.7%

283nm 共役トリエン酸痕跡

過酸化物量: 電位差測定法 25mg/kg

キャピラリーカラムGC: カーボワックス 20N
液相、50m, 200℃

加水分解して得たEPAをジオクサネンでメチル化して測定した。二重結合のマイグレーションに基因するアーティファクトは認められなかった。1-ミリスチル-EPA 1g(2.3mN)とEPAクロライド1.48g(4.6mN)を溶かした脱色ジクロルメタン溶液15mlに加え、さらにジメチルアミノピリジン0.28g(2.3mN)を加え、37℃で攪拌しながら一昼夜反応させた。室温放冷後、脱色冷アセトン40mlを添加して微細な白色沈殿が生じた。得られた白色沈殿はクロロホルム/メタノール(2/1, v/v)混液50mlに溶解してシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4, v/v/v)混液にて溶出し、Sn-1-ミリスチル-2-EPA-GPC 1.6gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(N+H)^+$ 752

7mg, 0.1N塩化カルシウム溶液2ml, 0.2Nトリス-塩酸緩衝液3mlを添加して、37℃で攪拌しながら一昼夜反応させた。エタノールで反応を止め、Bligh-Dyer法により抽出した。抽出液を留去した後、冷アセトンで洗浄して遊離脂肪酸を除き、粗リゾPC 4.6gを得た。粗リゾPCをシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4, v/v/v)混液にて溶出しSn-1-ミリスチル-EPA-GPC 4.0gを得た。このものの分析値は次の通りである。

FAB-MS: $(N+H)^+$ 428

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, v/v/v) R_F値=0.1

EPA 10g(33.1mN)にジメチルホルムアミド1.2g(16.6mN)とオキシ塩化リン3.5g(23.1mN)の混液を38℃に保持しながら1時間かけて滴下した。さらに窒素気流下で30分間反応させた。窒素気流下、80~100℃で減圧蒸留してEPAクロライド8.2gを得た。このものの分析値は次の通りである。

IR: 1050~940cm⁻¹ トランス酸成跡

TLC: クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4, v/v/v) R_F値=0.3

得られたSn-1-ミリスチル-2-EPA-GPCの一部700mgを800μlのメタノールに溶解し、この溶液に細菌ホスホリパーゼC (Clostridium perfringens 菌、生化学工業(株)製)を400unit, 0.2Nトリス-塩酸緩衝液(pH=7.4)を6ml, 0.05N塩化カルシウムを3.5ml, エチルエーテルを4ml加えた。反応混合物をスクリーキャップ付20mlの試験管中にチフロンスターラーパーともに加えて35℃で1時間激しく攪拌しながらインキュベートした。反応混合物にエチルエーテルを12ml加えてから分液ロートに移し、抽出後、窒素気流下で濃縮した。この中に冷アセトン1mlを加えて沈澱除去し、硫酸ナトリウムで脱水し、窒素気流下で脱溶媒して、Sn-1-ミリスチル-EPA-DG 548mgを得た。このものの分析値は次の通りである。

外観: 淡黄色透明の油状液体

溶解状態: ヘキサン、クロロホルムに可溶、水に不溶

特開昭64-2589(8)

手 続 特 許 正 審

昭和63年2月25日

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

TLC: ①クロロホルム/メタノール/水(85/25/4,
v/v/v) Rf値=0.8

②クロロホルム/アセトン/メタノール(90
/8/1, v/v/v) Rf値=0.65

(Rf値0.65は標準体の未蒸留NG中のSn-1, 2 DG;
一般名β-DGの位置に相当した。)

①、②の呈色反応はドラージェンドルフ試薬とデ
イトマー・レスター試薬に対し陰性で、ヨウ素、
過マンガン酸カリ、硝酸に対し陽性であった。

FAB-MS: $([M+Na])^+$: 609,

比旋光度: $[\alpha]_D^{20} -4.7^\circ$ (C=0.22 CHCl₃)

HPLC: ODSカラム, メタノール 1ml/min

単一ピーク

キャピラリーGC: カーボワックス 20N液相,
50m, 200℃

加水分解して得た脂肪酸をジブチルメタンでメチ
ル化して測定した。ミリスチン酸とEPAが主成分
であり、二重結合のマイグレーションに基因する
アーティファクトは認められなかった。

過酸化物質: 電位差滴定法 33meq/kg
代理人 井理士 柳 威 成

1. 事件の表示

昭和62年 特許第 158726号

2. 発明の名称

高度不飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロールの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
名 称 (434) 日本油脂株式会社
代表者 岡 本 甲 子 男

4. 代理人 〒105 電話 436-4700

住 所 東京都港区西新橋3丁目15番8号
氏 名 西新橋中央ビル 503号
(5743) 井理士 柳 威 成

5. 補正命令の日付 自 発 補 正

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第14頁第3行「2.5」を「1.7」に訂正する。

(2) 同第15頁第12行「1.5」を「1.1」に訂正する。

(3) 同第16頁第10行「550」を「500」に訂正する。

(4) 同第19頁第8行「2.4」を「1.8」に訂正する。

(5) 同第21頁第11行「510」を「410」に訂正する。

(6) 同第24頁第6行「4.6」を「3.6」に訂正する。

(7) 同第24頁第9行「4.0」を「3」に訂正する。

(8) 同第26頁第16行「548」を「500」に訂正する。